



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

PCT/EPU 3 / 0 8 4 7 1 1
EP03/84711

REC'D 07 OCT 2003

WIPO PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02018157.4

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Anmeldung. Nr.:
Application no.: 02018157.4
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 19.08.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

MERCK PATENT GmbH
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C07K14/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**EPO - Munich
67
19. Aug. 2002**

Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras

Varianten des Majorallergens Phi p 1 aus Lieschgras

Die Erfindung betrifft Varianten des Majorallergens Phi p 1 aus Lieschgras, dadurch gekennzeichnet, daß eine bisher nicht mögliche Herstellung von monomeren, in physiologischen Medien löslichen und stabilen Molekülen mit Hilfe von prokaryontischen Expressionssystemen und deren anschließende Reinigung erfolgen kann.

Hintergrund der Erfindung

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 25% der Bevölkerung von industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma, die durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene) unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden hervorgerufen werden. Bis zu 40% dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE (Immunoglobulin E)-Reaktivität bei Gräserpollen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy. Clin. Immunol. 78, 1190-201).

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Histamin, Prostaglandinen) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit der Allergiker, die IgE-Antikörper gegen bestimmte Allergene aufweisen, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden. Im Fall vom Lieschgras (*Phleum pratense*) sind bislang Phi p 1 (Petersen et al., 1983, J. Allergy Clin. Immunol. 62, 789-796), Phi p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21, 297-307), Phi p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy

5 Immunol. 108, 49-54) und Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993) als Majorallergene und Phl p 4 (Löwenstein, 1978, Prog. Allergy 25, 1-62) sowie Gruppe 10 und 11 aus *Lolium perenne* (Ansari et. al., 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 80, 229-235) als Minorallergene charakterisiert worden.

10 Als eine der relevantesten Allergengruppen von Gräserpollen wird Gruppe 1 eingestuft (Tamborini, E. et al., Eur. J. Biochem. 1997, 249:886-894), zu der Phl p 1 aus Lieschgras gehört. Zu Phl p 1 weisen die weiteren Vertreter der Gruppe 1 aus anderen Gräsern Homologien von teilweise über 95% auf (Petersen, A., et al., J. Allergy Clin. Immunol. 1995, 95: 987-994). Aufgrund der hohen Homologien treten bei der Sensibilisierung mit einem Gras auch Reaktionen auf die Allergene anderer kreuzreaktiver Spezies auf. Deshalb sind diese Moleküle für entsprechende Diagnose- und Therapieansätze von übergeordneter Bedeutung.

15 Bei dem therapeutischen Einsatz dieser Allergene nutzt man die Reaktion mit T-Helferzellen, wobei es zu einer Umorientierung der pathologischen TH2-Zellen in den TH1-Typ kommt. Daraus ergibt sich eine Veränderung des Cytokinprofils derart, daß B-Zellen zur Bildung von IgG statt IgE
20 stimuliert werden.

Bei Phl p 1 handelt sich um ein Protein aus 240 Aminosäuren und einer N-Glykosylierungsstelle. Die Glykosylierungsanteil beträgt 5% des Molekulargewichtes, welches bei dem natürlichen Protein ca. 30-35 kDa beträgt (Petersen et al., Allergy Clin. Immunol. 1995, 95: 987-994; Suck et al., J. Immunol. Meth. 1999, 229:73-80).

25 Die Nukleinsäuresequenz von Phl p 1 ist bekannt (Laffer et al., J. Allergy Clin Immunol. 1994, 94: 689-698; Petersen et. al., J. Allergy Clin. Immunol., 1995, 95: 987-94) und kann somit zur rekombinanten
30 Herstellung des Moleküls genutzt werden.

Bisherige Versuche das Molekül in bakteriellen oder eukaryontischen Systemen, wie z.B. Hefe, rekombinant derart herzustellen, daß eine stabile monomere Form erhalten wurde, waren wegen seiner mangelhaften Löslichkeit nicht erfolgreich:

- 5 Im Fall der bakteriellen Expression lagert sich Phl p 1 als Einschlußkörper (inclusion bodies) ab (Vrtala et al., J. Allergy Clin. Immunol, 1996; 97: 781-7) und muß vor der Reinigung zunächst denaturiert werden. Im Anschluß wird das Denaturierungsmittel entzogen. Eine vollständige Rückfaltung des Proteins in die natürliche lösliche Konformation konnte allerdings nicht
- 10 erreicht werden.

Ein möglicher Hinderungsgrund für die Bildung einer stabilen Konformation hätte das Fehlen der Glykosylierung sein können. Jedoch wurde selbst in eukaryontischen Systemen, in denen Glykosylierung möglich ist, kein

stabiles Phl p 1 erhalten (K. Grobe, Dissertation, 1998, Universität

15 Hamburg).

Als eine Ursache für die fehlende Löslichkeit wird stattdessen eine proteolytische Aktivität vermutet, die zur Selbstdegradation des Moleküls führt (Grobe et al., Eur. J. Biochem. 1999; 263: 33-40; Kirsten Gehlhar, Dissertation, 1998, Medizinische Universität zu Lübeck, Deutschland).

- 20 Daneben kommen auch hydrophobe Interaktionen zwischen den Molekülen als Ursache für die Aggregation in Frage.

Die der vorliegenden Erfindung zugrund liegende Aufgabe bestand somit in der Bereitstellung von Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus

- 25 Lieschgras, die sich bei vollem Erhalt der therapeutisch und diagnostisch bedeutsamen immunologischen Eigenschaften durch eine verbesserte Löslichkeit auszeichnen und die sich somit in pharmazeutisch geeigneter Form aufreinigen lassen.

30

Abbildungen

Abbildung 1: Nukleinsäuresequenz und deduzierte Aminosäuresequenz von rPhl p 1-T236C.

Das veränderte Triplet zur Erzeugung eines Cysteinrestes ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Abbildung 2: SDS-PAGE des Wildtyps nPhl p 1 (n=natürlich) sowie der Faltungsvarianten LM und HM der Allergenvariante rPhl p 1-T236C (r=rekombinant) unter reduzierenden (in Anwesenheit von Dithiothreitol DTT) und nicht reduzierenden (ohne DTT) Bedingungen.

Bahn 1: Molekulargewichtsstandard (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160, 220 kDa, Bench Mark Protein Ladder, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Bahn 2: Extrakt aus *Phleum pratense*-Pollen

Bahn 3: nPhl p 1

Bahn 4: rPhl p 1-LM

Bahn 5: rPhl p 1-HM

Abbildung 3: Gelfiltration mit rPhl p 1-HM und rPhl p 1-LM an einer Sephacryl S100-Säule.

Die Abbildung zeigt, daß die beiden Faltungsvarianten unterschiedliche apparente Molekulargewichte aufweisen.

Abbildung 4: Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST). zur Quantifizierung der IgE-Bindung der Faltungsvarianten rPhl p 1-T236C -LM und -HM

Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration eines Inhibitors der IgE-nPhl p 1-Bindung in mol/l aufgetragen, auf der vertikalen Achse ist der Grad der Inhibierung in [%] angegeben. Die Messung erfolgte mit nPhl p 1 an der Festphase und einem typischen Serum eines Graspollenallergikers.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Einführung eines zusätzlichen Cystein-Restes, vorzugsweise im carboxyterminalen Teil (besonders bevorzugt ab Aminosäureposition 140) des Moleküls zu der
5 erfindungsgemäß verbesserten Löslichkeit bei unveränderter IgE-Aktivität und T-Zell-Reaktivität führt.

Die Erfindung betrifft daher Varianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, die gegenüber dem Wildtyp einen zusätzlichen Cys-Rest aufweisen, sowie von den Basismolekülen abgeleitete Fragmente und
10 Varianten, die die gleichen oder ähnliche vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungs-
gemäßen Varianten des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1, dadurch
15 gekennzeichnet, daß nach an sich bekannten Methoden in das Phl p 1-Gen durch Insertion oder Austausch ein Basentriplett kodierend für einen Cys-Rest eingeführt wird, das so veränderte Gen in einem Wirtsorganismus überexprimiert wird und die durch Überexpression erhaltene Allergenvariante gereinigt wird.

20 Vorzugsweise tragen die überexprimierten Allergenvarianten zu Reinigungszwecken einen gentechnisch eingeführten His-Tag. Die Reinigung des zunächst unlöslichen Rohproteins erfolgt dann über mehrere biochemische Trennschritte, umfassend eine zweistufige
25 Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographien und die Abspaltung des His-Tags. Zur Vor- und Nachreinigung können verschiedene andere Chromatographien sowie De- und Renaturierungsschritte zum Einsatz kommen.

30 Die vorliegende Erfindung umfaßt demnach eine gezielt veränderte Primärsequenz des rekombinanten Allergens rPhl p 1, die seine

rekombinante Herstellung in bakteriellen bzw. anderen Expressionssystemen und die anschließende Reinigung ermöglicht. Gegenstand der Erfindung sind somit auch DNA-Moleküle, welche für die erfindungsgemäßen Allergenvarianten kodieren.

5

Die rekombinanten Proteine sind autoproteolytisch inaktiv und können daher in stabiler monomerer Form in physiologischen, gepufferten oder je nach Applikation in anderen Lösungen gelagert werden. Die T-Zell-Stimulierung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen rekombinanten und natürlichem Phl p 1.

10

Die rekombinanten Allergenvarianten und die abgeleiteten Fragmente oder Varianten können somit zur Therapie von Graspollen-induzierten allergischen Erkrankungen genutzt werden.

15

Aufgrund dieser pharmazeutischen Eignung betrifft die vorliegende Erfindung die neuen Allergenvarianten auch in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel.

Weiterhin können die rekombinant hergestellten Allergenvarianten und Fragmente zur Diagnostik von Pollenallergien genutzt werden.

20

Bei der Herstellung des gentechnisch veränderten Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras wird der Aminosäureaustausch durch gerichteten Nukleotidaustausch, beispielsweise mittels PCR, bewirkt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, der Mutante rPhl p 1-T236C, wird das Threonin an Position 236 durch Cystein ausgetauscht (siehe Abb. 1). Die Austauschstelle könnte jedoch auch an einer beliebigen anderen Stelle des Moleküls, insbesondere jedoch des C-Terminus, lokalisiert sein. Als Folge des Austauschs wird gleichzeitig die für Phl p 1 bekannte proteolytische Aktivität eliminiert.

25

30

Als ein weiterer unerwarteter Effekt treten bei der erfindungsgemäßen Isolierung und Reinigung des Moleküls zwei Faltungsvarianten auf, die vollständig voneinander getrennt werden können.

- 5 Während sich die eine, als rPhl p 1-LM (LM = low molecular weight) bezeichnete Konformationsvariante aufgrund ihres ähnlichen bzw. identischen Laufverhaltens in der nicht reduzierenden SDS-PAGE (Abb. 2) und der Gelfiltration (bspw. an Sepharcryl S-100, vgl. Abb. 3) zu dem natürlichen Protein sehr ähnlich verhält, liegt die zweite, als rPhl p 1-HM (HM = high molecular weight) bezeichnete Variante in einer anderen
- 10 Faltungsform vor. Auch die IgE- Reaktivität differiert. Während rPhl p 1-LM eine dem natürlichen Protein vergleichbare Reaktivität aufweist, wird rPhl p 1-HM von IgE-Antikörpern weniger gut gebunden (s. Abb. 4).

-
- 15 Gegenstand der Erfindung sind somit unterschiedliche Faltungsformen der rPhl p 1-Allergenvariante T236C und ihre Verwendung für therapeutische und diagnostische Zwecke.

Beide Faltungsvarianten sind leicht löslich, stabil monomer und haben keine nachweisbare proteolytische/autoproteolytische Aktivität.

- 20 Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung dabei die Faltungsform rPhl p 1-LM der Allergenvariante T236C, die durch Ausführen der folgenden Verfahrensschritte erhalten werden kann:

- 25 Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid, Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographiesäule, Abspalten des His-Tags, erste Gelfiltration, Ni-Chelat-Affinitätschromatographie, Isolierung des Zielproteins aus dem Durchlauf, zweite, abschließende Gelfiltration.

- 30 Daneben betrifft die vorliegende Erfindung noch eine weitere Faltungsform - rPhl p 1-HM - der Allergenvariante T236C, erhältlich durch Ausführen der folgenden Verfahrensschritte:

5 Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid, Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographiesäule, Abspalten des His-Tags, erste Gelfiltration, Ni-Chelat-Affinitätschromatographie, Elution des Zielproteins mit einem Imidazolgradienten, zweite, abschließende Gelfiltration

10 Die Allergenvariante T236C und ihre Faltungsvarianten LM und HM können in hoher Reinheit erhalten werden und haben wertvolle pharmazeutisch relevante Eigenschaften. So können sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften als Gemisch aber auch einzeln zur Diagnostik (insbesondere rPhl p 1-LM) und Therapie (insbesondere rPhl p 1-HM) von allergischen Erkrankungen eingesetzt werden.

15 Die Erfindung betrifft daher ebenfalls die Verwendung der Allergenvarianten und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur spezifischen Immuntherapie sowie Diagnostik von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist

20 Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der Allergenvariante rPhl p 1-T236C-LM und/oder ihrer Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur *in vitro* Diagnostik von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist.

25 Ferner ist Gegenstand der Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine erfindungsgemäße Allergenvariante und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe. Hierbei können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit
30 mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

Werden die den erfindungsgemäßen Allergenvarianten (bspw. rPhl p 1–
T236C) zugrunde liegenden DNA-Moleküle mit einem geeigneten
Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte zudem als Präparate für
5 eine Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) angewendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist daher ebenfalls ein rekombinanter DNA-
Expressionsvektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül, zur
Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1
10 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung des besagten
Expressionsvektors und/oder seiner Derivate, einschließlich deren
~~Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur~~
15 Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1
aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

Schließlich ist Gegenstand der Erfindung eine pharmazeutische
Zubereitung, enthaltend den besagten Expressionsvektor und/oder seine
20 pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen
in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe,
zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen
Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-
Vakzinierung.

25

Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne dieser Erfindung können als
Therapeutika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als
Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage,
30 die sich für die parenterale Applikation eignen und mit erfindungsgemäßen
Allergenvarianten des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras nicht
reagieren. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen,

vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Die erfindungsgemäßen Allergenvarianten können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.

5

Weiterhin können durch entsprechende Formulierung der erfindungsgemäßen Allergenvarianten Depotpräparate, beispielsweise durch Adsorption an Aluminiumhydroxid, erhalten werden.

10

Naturgemäß sind über die erfindungsgemäßen Mutationen auch weitere punktuelle Veränderungen an anderen Positionen sowie sonstige Modifikationen – etwa zur Erhöhung der Hypoallergenität möglich. Bei diesen Modifikationen kann es sich beispielsweise um chemische Modifikationen des Allergenextrakts handeln (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7), 377-382). Sie können aber auch gentechnisch auf DNA-Ebene erfolgen, wobei z.B. Aminosäure-Insertionen, -Deletionen und -Austausche, Aufspaltungen des Proteins in Fragmente sowie Fusionen des Proteins oder seiner Fragmente mit anderen Proteinen oder Peptiden in Frage kommen.

15

20

25

Angesichts der hohen Sequenzhomologien innerhalb der Gruppe 1 Graspollenmajorallergene sind sämtliche, hier für Phl p 1 beschriebenen Effekte betreffend die Verbesserung der Löslichkeit durch Einführung eines Cys-Restes und das Auftreten von Faltungsvarianten auch für andere Vertreter dieser Gruppe zu erwarten.

30

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, dass ein Fachmann die obige Beschreibung in weitestem Umfang nutzen kann. Die nachfolgend beispielhaft beschriebene skizzierte, bevorzugte Ausführungsform gemäß Tab. 1 ist deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen. Sämtliche Chromatographiematerialien werden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) kommerziell vertrieben.

10 Beispiel 1: Gewinnung von rPhl p 1-T236C-LM und -HM

Die für das Phl p 1 kodierende Sequenz wurde mit 5'- und 3'-spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und in einen pProEx-Vektor (GIBCO, La Jolla, USA) über die Ehe I und Hind III Schnittstelle ligiert. Der

3'-Primer wurde an Basenposition 706/707 von GC nach TG derart

verändert, daß aus einem für Alanin kodierendes ein für Cystein kodierendes Triplet entsteht (Essential Molecular Biology; T.A. Brown ed., IRL Press, Oxford, 1994). Die Transformation erfolgte in *E. coli* Origami. Der gewählte Ausgangsvektor pProEx liefert die N-terminalen Ende lokalisierte 6xHis Sequenz, gefolgt von einer Erkennungssequenz für die TEV-Protease.

Die nach der bakteriellen Expression als unlösliche Aggregate vorliegenden rekombinanten, primär 6xHIS getaggtten rPhl p 1-A236C-Moleküle werden nach Vorreinigung in 6 M Guanidiumchlorid (GdmCl), 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) gelöst. Es schließt sich eine zweistufige Ni-Chelat-

Affinitätschromatographie an:

In einem ersten Schritt werden die unter denaturierenden Bedingungen an Chelating Sepharose gebundenen Proteine durch einen Gradienten über 90 min von der Denaturierungslösung in einen Puffer bestehend aus 50 mM Phosphatpuffer und 500 mM NaCl (pH 7.4) überführt. Es schließt sich eine Stufenelution mit 500 mM Imidiazol in Phosphatpuffer an. Das

renaturierte Fusionsprotein wird mittels einer spezifischen TEV-Protease in rPhl p 1 und den 6xHis Fusionsanteil gespalten.

Zur Vorbereitung auf eine zweite Affinitätschromatographie wird eine Gelfiltration mit Sephadex G-25 und Phosphatpuffer als Elutionsmittel durchgeführt, wodurch das Imidiazol entzogen wird.

Das umgepufferte Proteingemisch wird nun zu einer zweiten Ni-Chelat-Affinitätschromatographie eingesetzt. Dabei befindet sich ein Teil des erfolgreich gespaltenen rPhl p 1 im Durchlauf. Es handelt sich hierbei um die LM-Form des Moleküls. An der Säule bleibt neben ungespaltenen Molekülen auch die Konformationsvariante HM haften, offenbar bedingt durch exponierte Histidinreste. Diese gespaltene Variante eluiert in einem Imidazolgradienten eher als die ungespaltenen Fusionsproteine, wodurch auch diese Form hochrein erhalten werden kann. In einem letzten Schritt wird zur Endreinigung und Überführung in ein gewünschtes Lösungsmittel eine Gelfiltration mit Superdex 75 durchgeführt.

Tab. 1 Übersicht über das erfindungsgemäße Herstellungs- und Reinigungsverfahren

- | | |
|--|--|
| 1. Expression | |
| 2. Isolierung der Inclusion Bodies | |
| 3. Denaturierung | |
| 4. Ni-Chelat-Affinitätschromatographie 1 (Renaturierung) | |
| 5. Abspaltung des HIS-Tags | |
| 6. Gelfiltration (Sephadex G-25) | |
| 7. Ni-Chelat-Affinitätschromatographie 2: | Durchlauf: rPhl p 1-LM
Eluat: rPhl p 1-HM,
ungespaltenes His-rPhl p 1-
Fusionsprotein |
| 8. Gelfiltration (Superdex 75) | |

Beispiel 2: Unterschiedliche IgE-Bindungen des Wildtyps sowie der Faltungsvarianten LM und HM der Allergenvariante rPhl p 1-T236C

In einem gemäß Suck et al. (Int. Arch. Allergy Immunol. 2000; 121: 284-291) durchgeführten EAST-Inhibitionsassay mit einem Allergiker-Serumpool werden das natürliche nPhl p 1 und die rekombinanten rPhl p 1 Varianten HM sowie LM hinsichtlich der Stärke ihrer IgE-Bindung miteinander verglichen (Abb. 4). Es zeigt sich, daß die Variante HM in ihrer IgE-Bindung gegenüber dem natürlichen Phl p 1 Protein deutlich reduziert ist, während die Variante LM eine mit dem natürlichen Phl p 1 Protein vergleichbare IgE-Bindung aufweist.

15

20

25

30

Patentansprüche

- 5 1. Variante des Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegenüber dem Wildtyp einen zusätzlichen Cys-Rest aufweist.
2. Allergenvariante nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zusätzliche Cys-Rest im carboxyterminalen Bereich befindet.
- 10 3. Allergenvariante nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zusätzliche Cys-Rest in einer höheren als der Aminosäureposition 140 befindet
- 15 4. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zusätzliche Cys-Rest aus einem Aminosäureaustausch hervorgegangen ist.
- 20 5. Allergenvariante rPhl p 1-T236C gemäß Abb. 1 nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der zusätzliche Cys-Rest durch Austausch von Thr 236 eingeführt wurde.
- 25 6. DNA-Molekül, welches für eine Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 kodiert.
7. DNA-Molekül gemäß Abb. 1, welches für die Allergenvariante nach Anspruch 5 kodiert.
- 30 8. Verfahren zur Herstellung einer Variante des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1 gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß nach an sich bekannten Methoden - in das entsprechende Gen durch Insertion oder Austausch ein

- Basentriplett kodierend für einen Cys-Rest eingeführt wird,
- das so veränderte Gen in einem Wirtsorganismus überexprimiert wird
und
- die durch Überexpression erhaltene Allergenvariante gereinigt wird.

5

9. Verfahren zur Aufreinigung einer Variante des rekombinanten Majorallergens rPhl p 1 gemäß Anspruch 8 in löslicher Form, dadurch gekennzeichnet,
daß ausgehend von dem zu Reinigungszwecken mit einem His-Tag versehenen überexprimierten, zunächst unlöslichen Rohprotein
mehrere biochemische Reinigungsschritte, umfassend eine zweistufige Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographien und die Abspaltung des His-Tags, ausgeführt werden.

10

10. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie in unterschiedlichen Faltungsformen vorliegt.
11. Faltungsform rPhl p 1-T236C-LM der Allergenvariante gemäß Anspruch 5, erhältlich durch Ausführen der folgenden Verfahrensschritte:
- Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid
- Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographiesäule
- Abspalten des His-Tags
- Gelfiltration
- Ni-Chelat-Affinitätschromatographie
- Isolierung des Zielproteins aus dem Durchlauf
- Gelfiltration
12. Faltungsform rPhl p 1- T236C-HM der Allergenvariante gemäß Anspruch 5, erhältlich durch Ausführen der folgenden

Verfahrensschritte:

- Denaturierung der aus dem Wirtsorganismus isolierten Einschlußkörper mit Guanidiniumchlorid
- Renaturierung des gelösten Proteins auf einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographiesäule
- Abspalten des His-Tags
- Gelfiltration
- Ni-Chelat-Affinitätschromatographie
- Elution des Zielproteins mit einem Imidazolgradienten
- Gelfiltration

13. Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 und 12 als Arzneimittel.

14. Verwendung der Allergenvariante gemäß Anspruch 13 und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur spezifischen Immuntherapie von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist.

15. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine Allergenvariante gemäß Anspruch 13 und/oder ihre pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe.

16. Verwendung einer Allergenvariante nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 und 11 und/oder ihrer Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur *in vitro* Diagnostik von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist.

17. Rekombinanter DNA-Expressionsvektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach Anspruch 6 oder 7, zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

5

18. Verwendung des Expressionsvektors nach Anspruch 17 und/oder seiner Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

10

19. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 17 und/oder seine pharmazeutisch verwendbaren

Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe, zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung das Majorallergen Phl p 1 aus Lieschgras beteiligt ist, durch immuntherapeutische DNA-Vakzinierung.

15

20

25

30

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft pharmazeutisch bedeutsame Varianten des
Majorallergens Phl p 1 aus Lieschgras, dadurch gekennzeichnet, daß eine
bisher nicht mögliche Herstellung von monomeren, in physiologischen
Medien löslichen und stabilen Molekülen mit Hilfe von prokaryontischen
Expressionssystemen und deren anschließende Reinigung erfolgen kann.

10

15

20

25

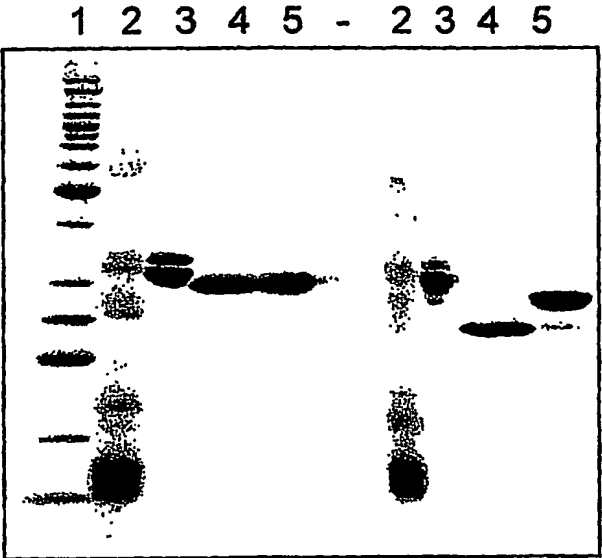
30

EPO - Munich
67

19. Aug. 2002

	9			18			27			36			45					
5'	ATC	CCC	AAG	GTT	CCC	CCC	GGC	CCG	AAC	ATC	ACG	GCG	ACC	TAC	GGC	GGC	AAG	TGG
	I	P	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	G	K	W
	63			72			81			90			99			108		
	CTG	GAC	GCG	AAG	AGC	ACC	TGG	TAC	GGC	AAG	CCG	ACG	GCC	GCC	GGT	CCC	AAG	GAC
	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	P	T	A	A	G	P	K	D
	117			126			135			144			153			162		
	AAC	GGC	GGC	GCG	TGC	GGG	TAC	AAG	GAC	GTG	GAC	AAG	CCC	CCG	TTC	AGC	GGC	ATG
	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	P	P	F	S	G	M
	171			180			189			198			207			216		
	ACC	GGC	TGC	GGC	AAC	ACC	CCC	ATC	TTC	AAG	TCC	GGC	CGG	GGC	TGC	GGC	TCC	TGC
	T	G	C	G	N	T	P	I	F	K	S	G	R	G	C	G	S	C
	225			234			243			252			261			270		
	TTC	GAG	ATC	AAG	TGC	ACC	AAG	CCC	GAG	GCC	TGC	TCC	GGC	GAG	CCC	GTG	GTG	GTC
	F	E	I	K	C	T	K	P	E	A	C	S	G	E	P	V	V	V
	279			288			297			306			315			324		
	CAC	ATC	ACC	GAC	GAC	AAC	GAG	GAG	CCC	ATC	GCC	GCG	TAC	CAC	TTC	GAC	CTC	TCC
	H	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S
	333			342			351			360			369			378		
	GGC	ATC	GCG	TTC	GGG	TCC	ATG	GCC	AAG	AAG	GGC	GAC	GAG	CAG	AAG	CTG	CGC	AGC
	G	I	A	F	G	S	M	A	K	K	G	D	E	Q	K	L	R	S
	387			396			405			414			423			432		
	GCC	GGC	GAG	GTG	GAG	ATC	CAG	TTC	CGC	CGC	GTC	AAG	TGC	AAG	TAC	CCG	GAG	GGC
	A	G	E	V	E	I	Q	F	R	R	V	K	C	K	Y	P	E	G
	441			450			459			468			477			486		
	ACC	AAG	GTG	ACC	TTC	CAC	GTG	GAG	AAG	GGG	TCC	AAC	CCC	AAC	TAC	CTG	GCG	CTG
	T	K	V	T	F	H	V	E	K	G	S	N	P	N	Y	L	A	L
	495			504			513			522			531			540		
	CTG	GTG	AAG	TTT	GTC	GCC	GGC	GAC	GGC	GAC	GTG	GTG	GCG	GTG	GAC	ATC	AAG	GAG
	L	V	K	F	V	A	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E
	549			558			567			576			585			594		
	AAG	GGC	AAG	GAC	AAG	TGG	ATC	GCG	CTC	AAG	GAG	TGC	TGG	GGA	GCC	ATC	TGG	AGG
	K	G	K	D	K	W	I	A	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R
	603			612			621			630			639			648		
	ATC	GAC	ACC	CCG	GAG	GTG	CTC	AAG	GGC	CCC	TTC	ACC	GTC	CGC	TAC	ACC	ACC	GAG
	I	D	T	P	E	V	L	K	G	P	F	T	V	R	Y	T	T	E
	657			666			675			684			693			702		
	GGC	GGC	ACC	AAG	GGC	GAG	GCC	AAG	GAC	GTC	ATC	CCC	GAG	GGC	TGG	AAG	GCC	GAC
	G	G	T	K	G	E	A	K	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D
	711			720														
	ACC	<u>TGC</u>	TAC	GAG	TCC	AAG	TGA	3'										
	T	C	Y	E	S	K	*											

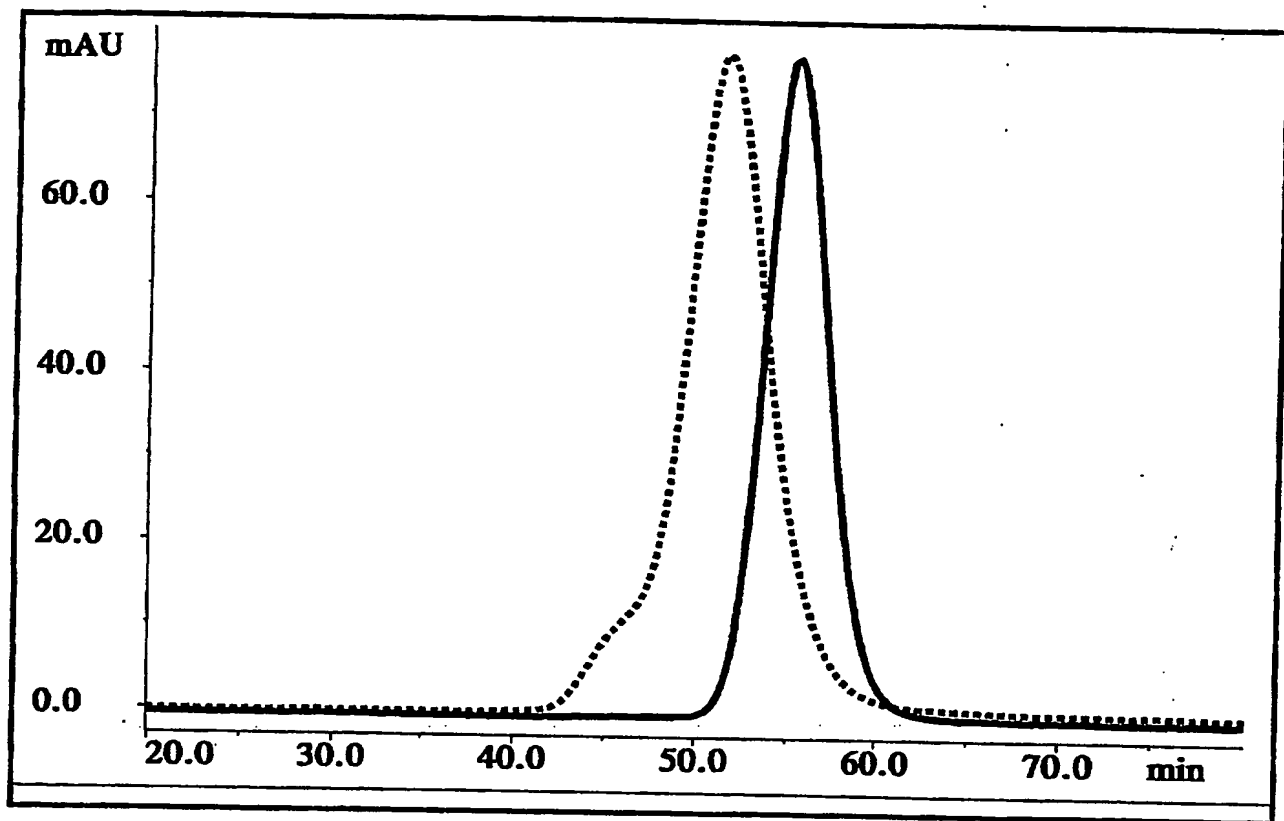
Abbildung 2: SDS-PAGE von nPhl p 1, rPhl p 1-LM und rPhl p 1-HM



+ DTT

- DTT

Abbildung 3: Gelfiltration mit rPhl p 1-HM und rPhl p 1-LM



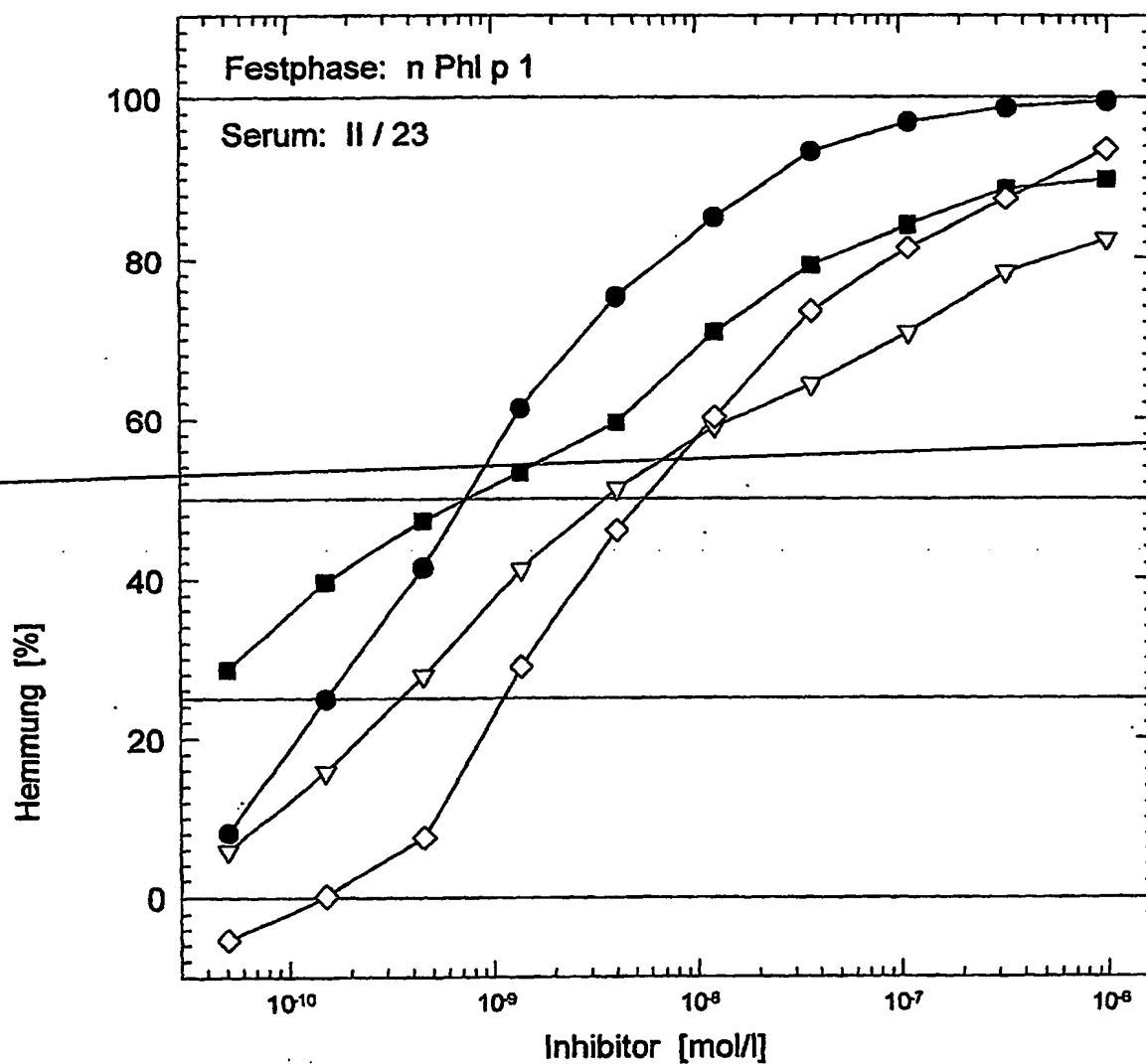
.....rPhl p 1-HM

——— rPhl p 1-LM

Elution bei: 51.41 min

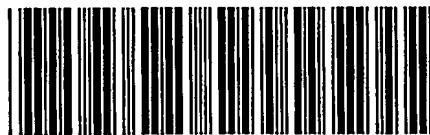
55.22 min

Abbildung 4: EAST-Inhibitionstest mit Faltungsvarianten rPhl p 1-T236C-LM und -HM



- n Phl p1, ab 10^{-6} mol / l
- ▽ r Phl p1 HM, ab 10^{-6} mol / l
- r Phl p1 LM, ab 10^{-6} mol / l
- ◇ Phleum pratense - Extrakt, ab 50 µg/ml

PCT Application
EP0308471



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.